

## 脳虚血による神経細胞死における恒常的活性型カルシニューリンの機能的役割

塩田倫史, 福永浩司\*

**The Functional Roles of Constitutively Active Calcineurin in Delayed Neuronal Death after Brain Ischemia**

Norifumi SHIODA and Kohji FUKUNAGA\*

*Department of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3 Aramaki-Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan*

(Received August 28, 2010)

Excessive  $\text{Ca}^{2+}$  elevation resulting from activation of NMDA and other  $\text{Ca}^{2+}$  channels is thought to play a pivotal role in pathologic events following brain ischemia. The  $\text{Ca}^{2+}$  elevation directly triggers necrotic or apoptotic cell death through activation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin (CaM)-dependent enzymes, including calcineurin (CaN). CaN, a  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependent serine/threonine protein phosphatase, partly mediates apoptosis associated with neuronal death. In a mouse middle cerebral artery occlusion (MCAO) model, calpain, a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cysteine protease, converted CaN to the constitutively active form of 48 kDa *in vivo*. The calpain-induced CaN activation mediated delayed neuronal death through translocation of nuclear factor of activated T-cells (NFAT) and FKHR, a forkhead box class O family member (FOXO) into neuronal nuclei after brain ischemia. The FKHR activation occurred through decreased Akt activity with concomitant dephosphorylation by constitutively active CaN. Thereafter, FKHR formed a complex with CaN and in turn translocated into nuclei after brain ischemia. After nuclear translocation of NFAT and FKHR, the transcription factors stimulated expression of Fas-ligand by binding to its promoter regions. Taken together, constitutively active CaN mediates delayed neuronal death through Fas-ligand expression *via* up regulation of both NFAT and FKHR transcriptional activity in brain ischemia.

**Key words**—calcineurin; calpain; brain ischemia; Fas-ligand**1. はじめに**

脳は、エネルギーの貯蔵がほとんどないにもかかわらず極めて活発な代謝を行っている臓器で、多くの血流を要求し、全体の1/5–1/4の酸素とブドウ糖を消費する。<sup>1,2)</sup> 一方、エネルギー供給の遮断に対して極めて脆弱である。脳の虚血部位では短時間に再灌流が起これば脳機能の回復が期待されるが、一定時間以上の虚血が続くと不可逆的神経細胞障害が生じる。<sup>3)</sup> また、不可逆的変化に陥った虚血中心部位の周辺には虚血後も一時的に神経細胞が生存しているペナンプラと呼ばれる部分が存在するが、一定時間後に血流が回復しても一部はその後細胞死に至ることが知られており、遅発性神経細胞死と呼ばれて

いる。<sup>4)</sup>

脳虚血による神経細胞死の中で、ATPの枯渇によるネクローシスとは異なる遅発性の選択的神経細胞死の機序を説明する仮説として、現在最も重視されている仮説は「グルタミン酸・カルシウム仮説」である。この仮説はげっ歯類を用いた実験上の一過性脳虚血後の海馬錐体神経細胞死のみならず、臨床上のペナンプラ領域の神経細胞死にも当てはまる。<sup>5,6)</sup> 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は $\text{Ca}^{2+}$ 依存性プロテアーゼであるカルパインの活性化を起し、細胞骨格タンパク質を分解する。カルパインは、 $\text{Ca}^{2+}$ によって活性化される細胞内システインプロテアーゼである。<sup>7)</sup> 脳虚血障害においては、カルパインの基質であり細胞骨格タンパク質であるフォドリンの分解がみられ、カルパインが神経細胞膜構造を破壊する。<sup>8)</sup> タンパク質のリン酸化・脱リン酸化反応による細胞内情報伝達系に関しては、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性酵素の中でも、 $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin (CaM) 依存性一酸化

東北大学大学院薬学研究科薬理学分野 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

\*e-mail: fukunaga@mail.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウムS61で発表したものを中心に記述したものである。

窒素合成酵素 nitric oxide synthase (NOS) が脳虚血における神経細胞死に重要な役割を果たすことが示唆されている。NOS は CaM を介して活性化され、一酸化窒素 nitric oxide (NO) を産生する。脳虚血においては NO は持続的に産生され、<sup>9)</sup> ミトコンドリアの呼吸鎖の抑制や DNA 合成障害をもたらす。この際、NO は活性酸素であるスーパーオキシドラジカルと反応し、最も神経毒性のあるパーオキシナイトライトへと代謝され、組織障害を悪化させる。<sup>10,11)</sup> 一方、Ca<sup>2+</sup>/CaM 依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンも脳虚血における神経細胞死に関与することが示唆されているが、その詳細なメカニズムは明らかとされていない。本論文では脳虚血におけるカルシニューリン活性化機構と神経細胞死に関する研究について報告する。

## 2. 脳虚血におけるカルパインの活性化による恒常的活性型カルシニューリンの産生について

脳虚血に陥ると、NMDA 受容体と電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルの活性化により細胞外から過剰の Ca<sup>2+</sup> が流入し、Ca<sup>2+</sup> 依存性プロテアーゼであるカルパインが活性化されタンパク質の分解や変性が起こる。<sup>12,13)</sup> 変性タンパク質の蓄積は小胞体ストレスを引き起こし、アポトーシス関連遺伝子の誘導やミトコンドリア依存性アポトーシスが起こる。<sup>14-16)</sup> さらに、Ca<sup>2+</sup> は Ca<sup>2+</sup> 依存性酵素の活性化を介して神経細胞死を誘導する。特に、Ca<sup>2+</sup>/CaM 依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンは細胞死において重要な役割を担っている。実際に、カルシニューリン阻害薬である FK506 やシクロスポリン A は脳虚血やグルタミン酸神経毒性における神経細胞死を抑制する。<sup>17-20)</sup>

カルシニューリンはカルシニューリン A とカルシニューリン B の 2 つのサブユニットからなる 2 量体であり、脳内タンパク質の約 1% を占める神経細胞に豊富に存在する脱リン酸化酵素である。<sup>21)</sup> カルシニューリン A は脱リン酸化酵素活性も持った触媒領域と CaM 結合領域、カルシニューリン B 結合領域、自己抑制領域を持つ。一方、カルシニューリン B は 4 分子のカルシウムイオンが結合できる構造を持っている。この 2 つのサブユニットは強固に 1:1 で結合しホロ酵素を形成している。カルシニューリンは他の Ca<sup>2+</sup>/CaM 依存性酵素よりも低いカルシウム濃度で活性化する。言い換えれば、カ

ルシウムイオンに対して感受性が高い。<sup>22)</sup> しかし、生体内では種々の内在性活性抑制タンパク質と複合体を形成することにより活性が抑制されている。<sup>23-26)</sup>

カルシニューリンは細胞死において重要な役割を担っている。*in vitro* の実験では、カルシニューリンの活性化による NFAT の活性化は T 細胞のアポトーシスを誘導する。<sup>27)</sup> また、T 細胞ハイブリドーマにおける抗-CD3-抗体誘導性のアポトーシスは NFAT 活性化による細胞死因子 Fas-ligand の産生によるものであることが示唆されている。<sup>28)</sup> ヒト T 細胞においてもカルシニューリンを介した NFAT の脱リン酸化、それに伴う Fas-ligand の誘導はアポトーシスを誘導する。<sup>29)</sup> *in vivo* 実験においては、ラット線条体におけるメタンフェタミン誘導性の神経細胞死においてカルシニューリンの脱リン酸化による NFAT の活性化はアポトーシスの引き金となる。<sup>30)</sup> しかしながら、カルシニューリンの虚血性神経細胞死における役割は不明である。

脱リン酸化酵素カルシニューリンとタンパク質分解酵素カルパインはいずれも Ca<sup>2+</sup> 依存性に調節され、Ca<sup>2+</sup> によって活性化されるアポトーシスシグナルの開始点に位置している。これらは、それぞれ神経細胞死などで重要な働きをするとされてきたものの、これまでは互いに独立した系であると考えられてきた。しかしながら、近年、神経毒であるカイニン酸処理による神経細胞死において、Ca<sup>2+</sup> 上昇により活性化されたカルパインがカルシニューリンの限定分解を引き起こし、その結果カルシニューリンは Ca<sup>2+</sup> 非依存性の恒常的活性型に変化し細胞死を引き起こすことが示唆された。カルシニューリンに Ca<sup>2+</sup>/CaM が結合すると、A サブユニットの自己抑制領域が触媒領域から離れ、カルシニューリンは活性化状態となる。この変化は可逆的であり、生理的な Ca<sup>2+</sup> 上昇においてはカルシニューリンの活性化反応は一過性である。しかし、カイニン酸誘発性の神経細胞死では細胞内へ過剰なカルシウム上昇が起こるとカルパインが活性化され、カルパインが A サブユニットの自己抑制領域を切断することにより、カルシニューリンは 48 kDa の恒常的活性化状態となる (Fig. 1)。しかしながら、脳虚血に伴って恒常的活性型カルシニューリンが産生されるのか、さらにカルシニューリンによってどのようなアポトーシス関連遺伝子が誘導されるのか明らかとな

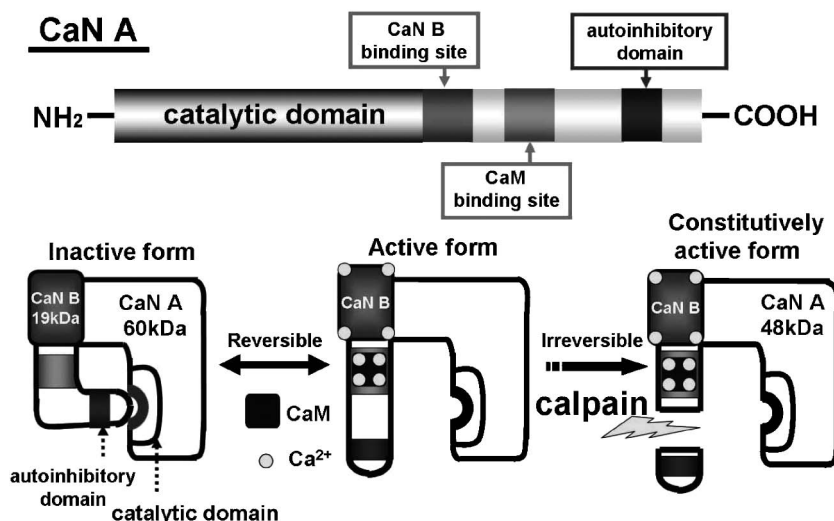


Fig. 1. Schematic Drawing of Calcineurin (CaN) Structure

っていない。

私達は、カルパインによるカルシニューリンの分解が脳虚血によって起こるか検討するため、48 kDa カルシニューリンの産生について解析した。脳虚血モデルは一過性中大脳動脈閉塞マウスを用いた。150 kDa フォドリン分解産物は脳虚血によってカルパイン特異的に分解され、産生するタンパク質である。<sup>8)</sup> 本研究ではカルパイン特異的の150 kDa 分解産物を特異的に認識する抗体を用いて免疫ブロットした。その結果、150 kDa フォドリン分解産物の産生の増加によって脳虚血後カルパインが活性化することが確認され、その分解は特に脳虚血再灌流0-2時間後に強く起こることが示唆された [Fig. 2(a)]. 150 kDa フォドリン分解産物の産生と同じ時間経過で、48 kDa カルシニューリンが脳虚血再灌流0-2時間後に一過性に有意な上昇がみられた [Figs. 2(a) and (b)]. この48 kDa カルシニューリンの産生がカルシニューリン活性上昇と相関するか検討するため、免疫沈降法による脱リン酸化酵素活性測定を用いて  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  存在下及び非存在下の条件で活性測定を行った。48 kDa カルシニューリンタンパク質の産生と一致して、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  非依存性のカルシニューリン活性が脳虚血再灌流2時間後をピークとして有意に上昇した [Fig. 2(c)]. さらに、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  依存性の総カルシニューリン活性に関しても脳虚血再灌流0-6時間後に有意な増加がみられた。

また、脳内で恒常的活性型カルシニューリンが

NFATc4の核内移行に関与するか検討を行ったところ、NFATc4は虚血再灌流0-2時間後に細胞質画分において有意に減少し、核抽出物において増加した。核抽出物におけるNFATc4の増加は48 kDa カルシニューリンの産生の時間的経過と一致することから、虚血条件においてNFATc4は恒常的活性型カルシニューリンによって脱リン酸化されている可能性が示唆された。さらに免疫染色の結果からも、脳虚血後NFATc4だけでなくカルシニューリンも核内移行することが示唆された。<sup>31)</sup>

### 3. 脳虚血におけるカルシニューリン活性化反応に伴うNFATとFKHRの脱リン酸化反応とFas-ligand誘導との関連性

神経細胞にはストレスに対する様々な防御機構が備わっている。脳虚血においてもHeat shock proteinなどの熱ショックタンパク質が誘導される。<sup>32)</sup> また、脳虚血に伴ってチロシンキナーゼ系が亢進することから、種々の細胞成長因子や増殖因子の受容体の活性化反応が起こると考えられる。主要なものとしては脳由来神経栄養因子(BDNF)が誘導される。<sup>33)</sup> このように神経細胞における生存シグナルが脳虚血において活性化されることは神経細胞のストレスに対する防御反応と考えられている。私達はこれまで生存シグナルのAkt (Protein kinase B) 活性の減少は脳虚血において神経細胞死を引き起こすことを示唆してきた。<sup>34-40)</sup> Aktは細胞質において、Caspase-9,<sup>41)</sup> class O members of the forkhead family (FOXO),<sup>42)</sup> Bad,<sup>43)</sup> などのアポトーシス誘導因

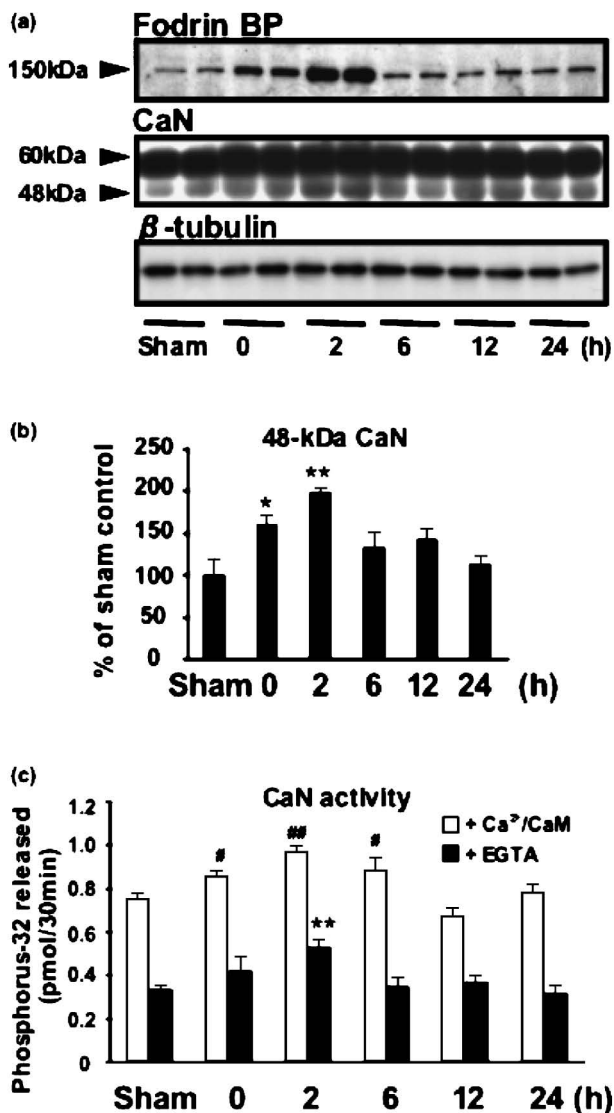


Fig. 2. Production of a 150-kDa Fodrin Breakdown Product and a 48-kDa Constitutively Active CaN and Changes in  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -dependent and -independent CaN Activities after Ischemia

(a) Extracts obtained from the ipsilateral hemisphere subjected to MCAO were analyzed in immunoblotting using a specific antibody recognizing the 150-kDa fodrin breakdown product (fodrin BDP), calcineurin (CaN), and  $\beta$ -tubulin. Top, representative images of an immunoblot showing the 150-kDa fodrin BDP. Middle, representative images of an immunoblot showing 60- and 48-kDa CaN. Bottom, representative images of an immunoblot showing  $\beta$ -tubulin. (b) Quantitative analysis of cleaved 48-kDa CaN was performed by densitometric scanning of immunoreactive bands. (c) The activities of  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -dependent (open bars) and  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -independent (closed bars) enzymes in extracts were measured. Values represent mean  $\pm$  S.E.M. of data from four independent experiments. # $p < 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.01$  vs. sham-operated animals (modified from Ref. 31).

子をリン酸化し、不活性化することで神経細胞の生存を促進する。Aktの下流標的分子のFOXOsはフォークヘッド型のDNA結合ドメインを持つ転写因子で、主にインスリンシグナル経路によって制御される。FOXOファミリーの機能は細胞周期やアポ

トーシスの制御、DNA修復、酸化ストレスに対する防御など多岐にわたるが、その詳しい分子機構についてはほとんど明らかにされていない。FOXOファミリーの中で、FOXO1 (forkhead in rhabdomyosarcoma; FKHR) は *C. elegans* の DAF-16 と相同のフォークヘッド型転写因子で FKHR は核内で細胞死誘導タンパク質である Fas-ligand や Bim を誘導する転写因子である。FKHR は Akt により Ser-256 をリン酸化されることによって 14-3-3 タンパク質にトラップされ、核内移行とその転写活性が阻害される。<sup>42,44,45</sup> 私達はこれまでの研究で、脳虚血において Akt 活性の減少により、なんらかの脱リン酸化酵素によって FKHR (Ser-256) が脱リン酸化され、核内移行を促進し、神経細胞死が引き起こされることを明らかにした。<sup>34,35,40</sup> 以上の背景に基づき、脳虚血後 FKHR がカルパインによって活性化された恒常的活性型カルシニューリンによって脱リン酸化されるか、また、恒常的活性型カルシニューリンに脱リン酸化された NFAT と FKHR は Fas-ligand の発現に係わるか脳虚血モデルで検討した。

Akt の活性化には Thr-308 と Ser-473 のリン酸化が必須である。<sup>46</sup> マウス中大脳動脈閉塞モデルを用いて Akt のリン酸化レベルを Ser-473 と Thr-308 を認識する抗体を用いて免疫ブロット法により検討を行ったところ、Phospho-(P-)Akt (Ser-473) は虚血再灌流 2 時間後に一過性に減少し、6 時間後には有意に上昇した。一方、Akt (Thr-308) は虚血再灌流 2-6 時間後にかけて有意に減少した。これらの結果はマウス中大脳動脈閉塞モデルにおいて Akt 活性が虚血再灌流 2-6 時間後に減少することを示唆している。また、Akt の下流の標的分子である P-FKHR (Ser-256) についても検討を行った。P-FKHR (Ser-256) は虚血再灌流 2-6 時間後に有意に減少した。この P-FKHR (Ser-256) の脱リン酸化の時間的变化は P-Akt (Thr-308) の低下と一致したことから、Akt 活性の減少は部分的に P-FKHR (Ser-256) のリン酸化の減少に関与すると考えられる。

次に、FKHR を脱リン酸化する脱リン酸化酵素について検討を行った。恒常的活性型カルシニューリンは虚血再灌流 2 時間後に最も活性化することを示唆している。<sup>31</sup> さらに、カルシニューリン活性と

P-FKHR (Ser-256) の脱リン酸化の時間的経過はほぼ一致している。これらの理由から、恒常的活性化型カルシニューリンは P-FKHR (Ser-256) を脱リン酸化する酵素である可能性が考えられる。カルシニューリンの特異的阻害剤である FK506 (3 mg/kg, i.p.) を脳虚血 10 分前に前投与し、P-FKHR (Ser-256) に関して虚血再灌流 2 時間後に検討を行ったところ、FK506 は部分的ではあるが、有意に FKHR の脱リン酸化を抑制した。

FKHR は脱リン酸化されると核内へ移行する。<sup>40,47)</sup> 一方、Shibasaki<sup>48)</sup> らは骨肉種 U2OS 細胞においてカルシニューリンが NFAT4 を脱リン酸化し、複合体を形成して核内移行することを示した。そこで、脳虚血後にカルシニューリンが FKHR と複合体を形成するか検討を行った。偽手術群、あるいは脳虚血処置群のサンプルをカルシニューリン抗体を用いて免疫沈降し、FKHR 抗体を用いて免疫ブロットを行い、免疫複合体を同定した [Fig. 3 (a)]。無処置群において、わずかに複合体が検出された (lane 1)。一方、虚血処置群ではカルシニューリン/FKHR 複合体が顕著に増加した (lane 2)。しかしながら、FK506 処置マウス脳においてはこの複合体の形成を抑制することができなかった (lane 3)。また、FKHR 抗体で免疫沈降を行い、カルシニューリン抗体で免疫ブロットを行ったところ [Fig. 3 (b)]、無処置群において、60 kDa 付近にわずかに複合体が検出された (lane 1)。一方、虚血群では、60 kDa 複合体が増加していることに加えて、48 kDa の複合体も検出された (lane 2)。これらの結果は、脳虚血において 60 kDa のみならず、48 kDa 恒常的活性化型カルシニューリンも FKHR との複合体を形成することを示唆している。さらに、脳虚血再灌流 2 時間後における海馬 CA1 領域の免疫染色を行い、カルシニューリンと FKHR の局在について検討した。カルシニューリンと FKHR は偽手術群のマウス海馬において CA1 錐体細胞の細胞質に局在がみられた。脳虚血再灌流 2 時間後においてはカルシニューリンと FKHR の局在が細胞質だけでなく、核内においても強い染色性がみられた [Fig. 3 (c)]。さらに、脳虚血群においてカルシニューリンと FKHR の核内における共局在は同じ神経細胞で多くみられた。これらの結果は、カルシニューリンは FKHR と複合体を形成し、FKHR を活

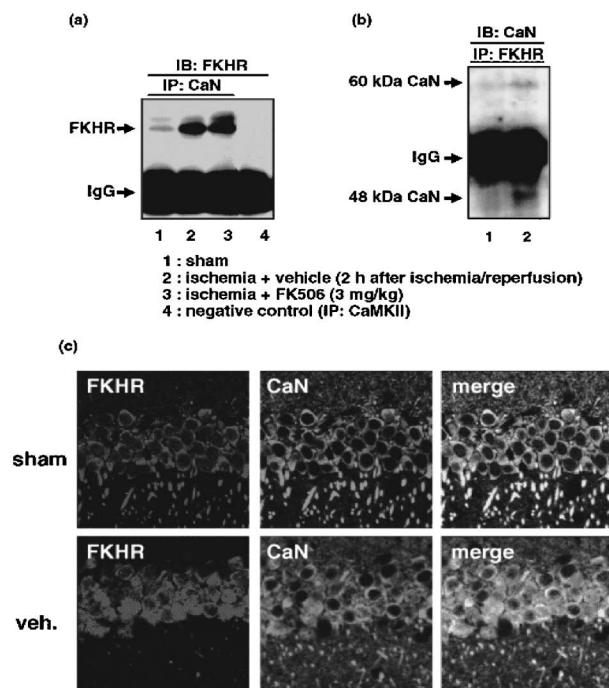


Fig. 3. CaN and FKHR Form a Complex, Which Translocates into Nuclei after Brain Ischemia

(a) Extracts were obtained from the ipsilateral hemisphere from sham-operated animals (lane 1) and ischemic animals subjected to MCAO for 2 h with vehicle (lane 2) or FK506 treatment (lane 3). The extracts underwent immunoprecipitation (IP) with the anti-CaN antibody, and immunoprecipitates were then analyzed by immunoblotting (IB) with anti-FKHR antibody. The negative control was immunoprecipitated with anti-CaMKII antibody (lane 4). (b) Extracts were obtained from sham-operated animals (lane 1) and ischemic animals subjected to MCAO for 2 h with vehicle (lane 2). The extracts underwent IP with the anti-FKHR antibody, and immunoprecipitates were then analyzed by IB with anti-CaN antibody. (c) Hippocampal slices from sham and ischemic animals 2 h after MCAO were double-stained with FKHR and CaN antibodies (modified from Ref. 49).

性化し核内移行して転写活性を上昇させることを示している。<sup>49)</sup>

また、脳虚血後に核内移行した FKHR と NFAT が細胞死関連因子の発現に係わるか検討するため、Fas-ligand のプロモーター領域内のオリゴヌクレオチドを用いてゲルシフトアッセイを行った。結果として、FKHR と NFAT の両方が虚血再灌流 2-6 時間後に Fas-ligand の転写活性を増加させることが示された。<sup>49)</sup>

#### 4. おわりに

これまでの結果を模式的に示す (Fig. 4)。脳虚血により細胞内への過剰な  $Ca^{2+}$  流入が起こり、また、Akt 活性が低下する。脳虚血による Akt 活性低下のメカニズムは現在のところ不明であるが、カルシニューリンが Akt の脱リン酸化反応に関与するという報告もある。<sup>50)</sup> 細胞内に過剰流入した

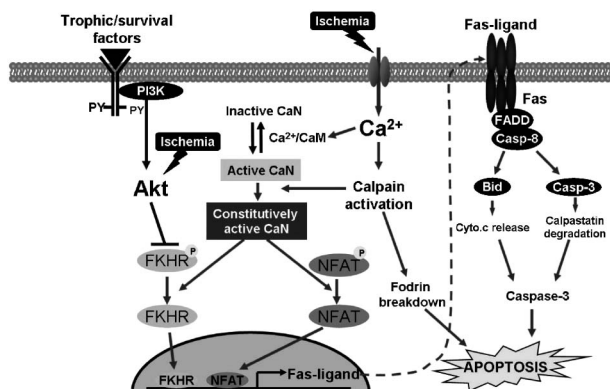


Fig. 4. Generation of Constitutively Active CaN and Fas-ligand Expression in Neurons after Brain Ischemia

Ca<sup>2+</sup> は Ca<sup>2+</sup> 依存性プロテアーゼであるカルパインを活性化する。また、同時にカルシニューリンも活性型となる。さらに、活性化したカルパインは活性型カルシニューリンを切断し、活性型カルシニューリンを恒常的活性型とする。恒常的活性型カルシニューリンは FKHR と NFAT を脱リン酸化し、それらと複合体を形成し、核内移行する。核内移行した FKHR と NFAT はそれぞれ Fas-ligand プロモーターに結合し、Fas-ligand の転写活性を上昇させる。Fas-ligand の発現上昇により、神経細胞死が引き起こされる。また、脳虚血における FK506 の神経保護効果のメカニズムには、カルシニューリン活性を抑制することにより、FKHR と NFAT の脱リン酸化を抑制すること、及びそれら転写因子により誘導される Fas-ligand の発現を抑制することが神経細胞死の抑制に関与することが今回の研究で示された。さらに、細胞の生存シグナルである Akt の上流を活性化する薬物である 4 価バナジウム化合物 VO (OPT) が Fas-ligand などのアポトーシス誘導因子発現を抑制することにより、マウス脳虚血における神経細胞死に対して抑制効果を持つことを明らかとした。<sup>51)</sup>

本総説では、マウス中大脳動脈閉塞モデルにおける恒常的活性型カルシニューリンの産生機序とカルシニューリン活性化による Fas-ligand の誘導メカニズムとその病態生理的意義に関して、いくつかの新しい知見を述べた。細胞内における恒常的活性型カルシニューリン産生によるカルシニューリン活性上昇は、今回検討した脳虚血だけでなく、カルパインが活性化するような神経変性疾患、例えば、グル

タミン酸誘発性神経毒、脳挫傷、アルツハイマー病などの病態においても起こることが予想される。<sup>52-57)</sup> 今回の研究が、神経変性疾患の原因療法に貢献でき、薬物治療の選択肢を広げる有用なものとなれば幸いである。

## REFERENCES

- 1) Takeo S., Taguchi T., Tanonaka K., Miyake K., Horiguchi T., Takagi N., Fujimori K., *Stroke*, **23**, 62-68 (1992).
- 2) Rami A., Agarwal R., Botez G., Winckler J., *Brain Res.*, **866**, 299-312 (2000).
- 3) Ksiezak H. J., Gibson G. E., *J. Neurochem.*, **37**, 305-314 (1981).
- 4) Ikeda J., Nagashima G., Saito N., Nowak T. S. Jr., Joo F., Mies G., Lohr J. M., Ruetzler C. A., Klatzo I., *Stroke*, **21** (11 Suppl), III65-III70 (1990).
- 5) Iadecola C., *Trends Neurosci.*, **20**, 132-139 (1997).
- 6) Barone F. C., Feuerstein G. Z., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **19**, 819-834 (1999).
- 7) Saido T. C., Sorimachi H., Suzuki K., *FASEB J.*, **8**, 814-822 (1994).
- 8) Saido T. C., Yokota M., Nagano S., Yamaura I., Tani E., Tsuchiya T., Suzuki K., Kawashima S., *J. Biol. Chem.*, **268**, 25239-25243 (1993).
- 9) Hashiguchi A., Yano S., Morioka M., Hamada J., Ushio Y., Takeuchi Y., Fukunaga K., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **24**, 271-279 (2004).
- 10) Aulak K. S., Miyagi M., Yan L., West K. A., Massillon D., Crabb J. W., Stuehr D. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12056-12061 (2001).
- 11) Bachschmid M., Thureau S., Zou M. H., Ullrich V., *FASEB J.*, **17**, 914-916 (2003).
- 12) Simon R. P., Swan J. H., Griffiths T., Meldrum B. S., *Science*, **226**, 850-852 (1984).
- 13) Choi D. W., Koh J. Y., Peters S., *J. Neurosci.*, **8**, 185-196 (1988).
- 14) Ohta S., Furuta S., Matsubara I., Kohno K., Kumon Y., Sasaki S., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **16**, 915-922 (1996).
- 15) Chen J., Nagayama T., Jin K., Stetler R. A., Zhu R. L., Graham S. H., Simon R. P., *J. Neurosci.*, **18**, 4914-4928 (1998).

- 16) Abe T., Takagi N., Nakano M., Furuya M., Takeo S., *Brain Res.*, **1009**, 159–168 (2004).
- 17) Liu J., Farmer J. D. Jr., Lane W. S., Friedman J., Weissman I., Schreiber S. L., *Cell*, **66**, 807–815 (1991).
- 18) Sharkey J., Butcher S. P., *Nature*, **22**, 336–339 (1994).
- 19) Uchino H., Ishii N., Shibasaki F., *Acta Neurochir. Suppl.*, **86**, 105–111 (2003).
- 20) Uchino H., Minamikawa-Tachino R., Kristian T., Perkins G., Narazaki M., Siesjo B. K., Shibasaki F., *Neurobiol. Dis.*, **10**, 219–233 (2002).
- 21) Kincaid R. L., Balaban C. D., Billingsley M. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1118–1122 (1987).
- 22) Klee C. B., Ren H., Wang X., *J. Biol. Chem.*, **273**, 13367–13370 (1998).
- 23) Liu J. P., Sim A. T., Robinson P. J., *Science*, **265**, 970–973 (1994).
- 24) Lai M. M., Hong J. J., Ruggiero A. M., Burnett P. E., Slepnev V. I., De Camilli P., Snyder S. H., *J. Biol. Chem.*, **274**, 25963–25966 (1999).
- 25) Lai M. M., Luo H. R., Burnett P. E., Hong J. J., Snyder S. H., *J. Biol. Chem.*, **275**, 34017–34020 (2000).
- 26) Dell'Acqua M. L., Dodge K. L., Tavalin S. J., Scott J. D., *J. Biol. Chem.*, **277**, 48796–48802 (2002).
- 27) Crabtree G. R., *Cell*, **96**, 611–614 (1999).
- 28) Dhein J., Walczak H., Baumler C., Debatin K. M., Krammer P. H., *Nature*, **373**, 438–441 (1995).
- 29) Latinis K. M., Norian L. A., Eliason S. L., Koretzky G. A., *J. Biol. Chem.*, **272**, 31427–31434 (1997).
- 30) Jayanthi S., Deng X., Ladenheim B., McCoy M. T., Cluster A., Cai N. S., Cadet J. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 868–873 (2005).
- 31) Shioda N., Moriguchi S., Shirasaki Y., Fukunaga K., *J. Neurochem.*, **98**, 310–320 (2006).
- 32) Nowak T. S., Ikeda J., Nakajima T., *Stroke*, **21**, 107–111 (1990).
- 33) Hsu C. Y., An G., Liu J. S., Xue J. J., He Y. Y., Lin T. N., *Stroke*, **24**, I78–I81 (1993).
- 34) Kawano T., Fukunaga K., Takeuchi Y., Morioka M., Yano S., Hamada J., Ushio Y., Miyamoto E., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **21**, 1268–1280 (2001).
- 35) Kawano T., Morioka M., Yano S., Hamada J., Ushio Y., Miyamoto E., Fukunaga K., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **22**, 926–934 (2002).
- 36) Yano S., Morioka M., Fukunaga K., Kawano T., Hara T., Kai Y., Hamada J., Miyamoto E., Ushio Y., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **21**, 351–360 (2001).
- 37) Fukunaga K., Kawano T., *J. Pharmacol. Sci.*, **92**, 317–327 (2003).
- 38) Hasegawa Y., Hamada J., Morioka M., Yano S., Kawano T., Kai Y., Fukunaga K., Ushio Y., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **23**, 1040–1051 (2003).
- 39) Hasegawa Y., Morioka M., Hasegawa S., Matsumoto J., Kawano T., Kai Y., Yano S., Fukunaga K., Kuratsu J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **317**, 875–881 (2006).
- 40) Fukunaga K., Ishigami T., Kawano T., *J. Pharmacol. Sci.*, **98**, 205–211 (2005).
- 41) Cardone M. H., Roy N., Stennicke H. R., Salvesen G. S., Franke T. F., Stanbridge E., Frisch S. Reed J. C., *Science*, **282**, 1318–1321 (1998).
- 42) Brunet A., Bonni A., Zigmond M. J., Lin M. Z., Juo P., Hu L. S., Anderson M. J., Arden K. C., Blenis J., Greenberg M. E., *Cell*, **96**, 857–868 (1999).
- 43) Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M. E., *Cell*, **91**, 231–241 (1997).
- 44) Biggs W. H. 3rd., Meisenhelder J., Hunter T., Cavenee W. K., Arden K. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7421–7426 (1999).
- 45) Dijkers P. F., Medema R. H., Lammers J. W., Koenderman L., Coffey P. J., *Curr. Biol.*, **10**, 1201–1204 (2000).
- 46) Alessi D. R., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P., Hemmings B. A., *EMBO J.*, **15**, 6541–6551 (1996).
- 47) Rena G., Prescott A. R., Guo S., Cohen P., Unterman T. G., *Biochem. J.*, **354**, 605–612 (2001).
- 48) Shibasaki F., Price E. R., Milan D., Mckee F., *Nature*, **25**, 370–373 (1996).
- 49) Shioda N., Han F., Moriguchi S., Fukunaga

- K., *J. Neurochem.*, **102**, 1506–1517 (2007).
- 50) Park C. H., Kim Y. S., Kim Y. H., Choi M. Y., Yoo J. M., Kang S. S., Choi W. S., Cho G. J., *Brain Res.*, **1234**, 148–157 (2008).
- 51) Shioda N., Ishigami T., Han F., Moriguchi S., Shibuya M., Iwabuchi Y., Fukunaga K., *Neuroscience*, **148**, 221–229 (2007).
- 52) Lee K. S., Frank S., Vanderklish P., Arai A., Lynch G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 7233–7237 (1991).
- 53) Saito K., Elce J. S., Hamos J. E., Nixon R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 2628–2632 (1993).
- 54) Hajimohammadreza I., Raser K. J., Nath R., Nadimpalli R., Scott M., Wang K. K., *J. Neurochem.*, **69**, 1006–1013 (1997).
- 55) Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B. A., Yuan J., *Nature*, **403**, 98–103 (2000).
- 56) Wu H. Y., Tomizawa K., Oda Y., Wei F. Y., Lu Y. F., Matsushita M., Li S. T., Moriwaki A., Matsui H., *J. Biol. Chem.*, **6**, 4929–4940 (2004).
- 57) Liu F., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Oda Y., Tomizawa K., Gong C. X., *J. Biol. Chem.*, **280**, 37755–37762 (2005).